

**POLYPEPTIDE AND DNA CODING THE POLYPEPTIDE**

**Patent number:** JP6189771  
**Publication date:** 1994-07-12  
**Inventor:** KURIHARA YOSHIE (JP); ARAI SOICHI (JP); ABE KEIKO (JP);  
YAMASHITA HARUYUKI (JP)  
**Applicant:** KURIHARA YOSHIE (JP); ARAI SOICHI (JP); ASAHI DENKA  
KOGYO KK (JP)  
**Classification:**  
**- International:** C12N15/29; A23L1/00; C12N1/21; C12P21/02; C12N15/29;  
A23L1/00; C12N1/21; C12P21/02; (IPC1-7): A23L1/00;  
C12N1/21; C12P21/02; C12N15/29; C07K13/00; C07K15/10;  
C12N1/21; C12R1/19; C12P21/02; C12R1/19  
**- european:**  
**Application number:** JP19920069835 19920219  
**Priority number(s):** JP19920069835 19920219; JP19910061012 19910304

Report a data error here

**Abstract of JP6189771**

**PURPOSE:**To provide a new DNA coding curculin B useful as a taste modifier, food, pharmaceuticals, etc. **CONSTITUTION:**A DNA containing the base sequence coding the polypeptide having the amino acid sequence of formula. It can be produced by preparing an oligonucleotide using the amino acid sequence of curculin A (refer to the specification of the Japanese Patent Laid-Open Hei 3-190899) and cloning a cDNA coding curculin B using the oligonucleotide as a probe.

Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Asp	His	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Cys	Asn	Leu	Val
		20						25						30	
Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Ser	Asn	Thr	Asp	Arg	Arg
		35					40					45			
Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Ile
		50					55					60			
Tyr	Asp	His	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Trp	Gly	Ser	Ala	Cys	Trp	Gly	Asp
		65				70				75				80	
Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe	Val	Ile
			85						90					95	
Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Trp	Ser	Leu	Gly	Pro	Asn	Gly	Cys	Arg	Arg	Val
			100						105					110	
Asn	Gly														

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 1 8 9 7 7 1

(43) 公開日 平成 6 年 (1 9 9 4) 7 月 1 2 日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/29				
C07K 13/00	ZNA	8318-4H		
15/10		8318-4H		
// A23L 1/00		H 8214-4B		
C12N 1/21		7236-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 1 3 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 4 - 6 9 8 3 5

(22) 出願日 平成 4 年 (1 9 9 2) 2 月 1 9 日

(31) 優先権主張番号 特願平 3 - 6 1 0 1 2

(32) 優先日 平 3 (1 9 9 1) 3 月 4 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 3 9 1 0 2 6 2 5 4

栗原 良枝

東京都世田谷区奥沢 7 - 4 - 7

(71) 出願人 5 9 1 0 5 8 9 9 8

荒井 綜一

神奈川県横浜市神奈川区七島町 3 8

(71) 出願人 0 0 0 0 0 0 3 8 7

旭電化工業株式会社

東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号

(72) 発明者 栗原 良枝

東京都世田谷区奥沢 7 - 4 - 7

(74) 代理人 弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドおよびそれをコードする DNA

(57) 【要約】

【構成】 クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) の果実から以下の配列で表されるアミノ酸配列からなる植物タンパク質クルクリン B をコードする塩基

配列を含む DNA を単離すると共に、以下の配列で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドを形質転換体により産生させた。

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu  
Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val  
Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg  
Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile  
Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp  
Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile  
Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val  
Asn Gly。

【効果】 味覚修飾物質である、植物タンパク質クルク

リン B の大量生産手段が提供される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 の配列で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド。

【請求項 2】 配列表の配列番号 2 の配列で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 の配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とする DNA。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 の配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とする DNA。

## 【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【産業上の利用分野】 本発明は、ポリペプチドおよびそれをコードする DNA に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】 クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) は、西マレーシアやタイ南部等に自生するきんばいざさ科 (または分類の仕方によってはひがんな科) に属する植物である。このクルクリゴ・ラチフォリアに含まれているタンパク質であるクルクリン同族体 (以下、クルクリンという) が味覚修飾物質として有用であることは、従来から本発明者らによって確認されている。そして、本発明者らは、特開平 2 - 1 0 4 2 6 3 号公報にクルクリゴ・ラチフォリアから得られたクルクリンについて記載し、特開平 2 - 8 4 1 5 7 号公報にはクルクリンの安定化方法を、そして特開平 2 - 8 4 1 6 0 号および特開平 2 - 8 4 1 6 1 号各公報にはクルクリンの加工方法を開示している。更に、特開平 3 - 1 9 0 8 9 9 号公報にはクルクリン同族体のひとつであるクルクリン A (以下、クルクリン A という) について、その全アミノ酸配列を記載している。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前記の特開平 2 - 1 0 4 2 6 3 号、特開平 2 - 8 4 1 5 7 号、特開平 2 - 8 4 1 6 0 号、特開平 2 - 8 4 1 6 1 号及び特開平 3 - 1 9 0 8 9 9 号の各公報に記載の技術では、クルクリゴ・ラチフォリア植物体から抽出しているためクルクリンの大量生産が困難であった。また、クルクリゴ・ラチフォリア植物体の処理が容易でなく、しかも抽出法によって得られたクルクリンは、それ自体の活性が低下しやすいという問題点があった。

【 0 0 0 4 】 本発明者は、クルクリンの大量生産手段を提供することを目指して、既に解明したクルクリン A のアミノ酸配列を利用してオリゴヌクレオチドを作成し、このオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてクルクリン B (以下クルクリン B という) をコードする cDNA をクローン化することに成功し、更にこのクローン化 DNA を組込んだプラスミドで形質転換させた微生物がクルクリン同族体のひとつであるクルクリン B を産生す

ることを確認し、本発明を完成した。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】 従って、本発明は、配列表の配列番号 1 の配列で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに関する。更に、本発明は、配列表の配列番号 1 の配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とする DNA にも関する。

【 0 0 0 6 】 クルクリンは、プレペプチドまたはプレプロペプチドを含む前駆体 (未成熟体) の形で植物細胞内に産生され、プロセッシングによりこのプレペプチドまたはプレプロペプチドが脱離して成熟体になるものと推定される。本発明者が見出したところによれば、成熟クルクリン B は配列表の配列番号 1 の配列に示すアミノ酸 1 1 4 個からなり、クルクリン B 前駆体は配列表の配列番号 2 の配列に示すアミノ酸 1 5 8 個からなる。従って、本発明は、配列表の配列番号 2 の配列で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドにも関する。更に、本発明は、配列表の配列番号 2 の配列で表されるアミノ酸配列からなるクルクリン B 前駆体をコードする塩基配列を含むことを特徴とする DNA、更に、クルクリン B 成熟体またはクルクリン B 前駆体を微生物や培養細胞によって生産するために、前記塩基配列に開始メチオニンをコードする A T G が結合した塩基配列からなる DNA にも関する。

【 0 0 0 7 】 天然または人工的変異により、主要な活性を変化させることなく、DNA の構造または対応するペプチドの構造の一部を変化させることができる。従って、本発明の前記各 DNA は、前記の全てのポリペプチドの相同変異体に相当する構造を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有する DNA も包含する。

【 0 0 0 8 】 クルクリン B をコードする DNA は、以下の方法によって得ることができる。

(A) mRNA の抽出

クルクリンを特に高濃度で産生する、クルクリゴ・ラチフォリアの果実を粉末状にし、この粉末試料から RNA を抽出する。RNA の抽出は、グアニジンチオシアネート法 [Maniatis ら: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1982)]、またはフェノール・SDS 法 [Brownerman ら: Biochemistry, 11, 637-641, (1972)] を用いて行うことができる。

【 0 0 0 9 】 グアニジンチオシアネート法は、試料にグアニジンチオシアネート液を添加後、ホモジナイズする。得られたホモジネートを、スイングローター用ポリアロマーチューブに入れて遠心し、RNA の沈殿を得る。この RNA の沈殿を精製して mRNA を得る。

【 0 0 1 0 】 フェノール・SDS 法は、試料粉末に、フ

フェノール、EDTAおよびSDS含有トリス塩酸緩衝液、並びにジチオスレイトールを添加して水層を得る。得られた水層には多糖類等のRNA以外の物質が含まれているので、塩化リチウムなどによる塩析操作を行って、RNAの沈殿を得る。続いて、RNA沈殿を適当な溶媒に再溶解し、オリゴ(dT)カラムによりmRNAを精製して抽出する〔Avivら: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1408-1418, (1972) 参照〕。本発明においては、クルクリゴ・ラチフォリア等の植物体の細胞膜が固いので、フェノール・SDS法を用いるのが好ましい。

【0011】(B) cDNAの合成およびベクターへのcDNAの挿入

cDNAの合成には、岡山-バーグの方法〔Okayamaら: Mol. Cell Biol. 2, 161, (1982)〕、またはグブラー-ホフマンの方法〔Gublerら: Gene 25, 263, (1983)〕等を利用することができる。

【0012】岡山-バーグ法を以下に説明する。

① pBR322-SV40ベクター用プラスミドを、制限酵素KpnIで切断した後、オリゴdTを添加する。次に、制限酵素HpaIを反応させた後、オリゴdAセルロース（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）カラムを用いてdTの付加していないものやオリゴdTの短いものを除いて、ベクタープライマーを調製する。

② 次に、別のpBR322-SV40融合プラスミドDNAを制限酵素PstIで切断して精製した後、オリゴdG鎖を付加して、制限酵素HindIIIで切断される塩基配列をもつリンカーDNAを調製する。

③ 精製したmRNAと、①で調製したベクタープライマーとを混合し、逆転写酵素によりcDNAを合成する。

④ 合成したcDNAを融合させたプライマーにオリゴdG鎖を付加した後、HindIIIにより消化し、cDNAが融合した端部とは反対側のオリゴdG鎖付加部分を除去する。

⑤ 前記の②で調製したオリゴdG鎖をもつリンカーDNAと、④で調製したベクタープライマーDNA-mRNAハイブリッドとを、T4リガーゼ等のDNA結合酵素を用いてHindIII断片をつないで環状化した後、リボヌクレアーゼHでRNAを部分的に消化する。続いて、RNA断片をプライマーとしてDNAポリメラーゼIでRNA鎖をDNA鎖に置換し、T4リガーゼでつないで二重鎖環状DNAに調製する。

⑥ コンピテント細胞を調製後、形質転換を行い、アンピシリンを含有する培地（例えば、 $\chi$ -プロス、LB-プロスまたはYT-プロス）で培養して目的とするDNAを含有するコロニーを得ることができる。

【0013】次に、グブラー-ホフマン法を説明する。この方法では、ベクターに $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$

ZAP等を用いることができる。

① 精製したmRNAのポリA部にアニールさせたオリゴdTをプライマーとし、逆転写酵素を用いて第一鎖cDNA（またはsscDNA）を合成する。

② 前記①で調製したcDNA-mRNAハイブリッドに、リボヌクレアーゼH等のエンド型RNA分解酵素を加えてmRNAを消化した後、dATP、dTTP、dGTPおよびdCTPを添加し、DNAポリメラーゼIまたはクレノウ断片等と反応させて、第二鎖cDNA（またはdscDNA）を合成する。

③ 前記②で調製したdscDNAは、T4DNAポリメラーゼ反応により両端をそろえ、EcoRIメチラーゼによりEcoRI部位をメチル化した後、EcoRIリンカーを両端に付加し、EcoRI消化を行う。

④ 前記③で調製したEcoRI消化cDNAとEcoRI消化 $\lambda$ gtベクターとをT4リガーゼによりライゲーションした後、パッケージングを行って、ライブラリーを作成する。

【0014】以上のようにして、cDNAの合成およびベクターへのcDNAの組み込みを行うが、本発明においては、後述の実施例で示すとおりグブラー-ホフマン法により行うのが好ましく、ベクターとしては $\lambda$ gt10を用いるのが好ましい。

【0015】(C) プロープの作成

クルクリンAは、既に本発明者等によってクルクリゴ・ラチフォリア植物体から精製され、そのタンパク質の全アミノ酸配列が解明されており、特開平3-190899号明細書に記載されている。このアミノ酸配列の適当な部分を選択してプロープを作成することができる。プロープとして用いるDNAの合成には、公知の方法〔例えば、DNA自動合成機を利用するホスホアミダイト法、日本生化学会編：遺伝子研究法I, 1-27, (1986) またはMatteucciら: Tetrahedron Lett., 21, 719, (1980)〕を使用することができる。

【0016】(D) スクリーニング

B項で作成されたcDNAライブラリーからの、目的遺伝子を含むブランクのスクリーニングは、C項で作成されたプロープを用いて行うことができる。まず、ブランクをナイロンメンブランまたはニトロセルロース等のフィルターメンブラン上に焼き付ける（ベッキング）。また、C項で得られたそれぞれのプロープを、Maniatisらの前述の文献に記載の方法等により( $^{32}$ P)等の放射性同位体でラベルする。上記のフィルターメンブラン上に焼き付けたブランクと、上記 $^{32}$ P等でラベルしたプロープとをハイブリダイゼーションさせ、目的遺伝子を含むブランクのスクリーニングを行うことができる。

【0017】更に、cDNAライブラリーからの、目的遺伝子を含むブランクのスクリーニングに、Glove



r : DNA Cloning, 1, 51-52, IRL Press に記載されている方法を用いることもできる。即ち、目的とする cDNA から発現したタンパク質の活性を検出したり、そのタンパク質に特異的な抗体を用いて目的とする cDNA から発現したタンパク質を検出することにより、目的とする cDNA を同定する、抗体によるスクリーニング方法である。しかしながら、本発明においては、ブランクハイブリダイゼーション（またはコロニーハイブリダイゼーション）による方法が望ましい。

#### 【0018】(E) サブクロニング

サブクロニングに用いるベクターとしては、例えば pUC 系（例えば、pUC7、pUC8、pUC9、pUC18 または pUC19）または pBR 系（例えば、pBR322、pBR325 または pBR327）のプラスミドを挙げることができ、特に pUC18 を用いるのが好ましい。前記のスクリーニング工程によって選択されたブランクまたはコロニーからファージ DNA またはプラスミド DNA を取り出して精製し、適当な制限酵素で消化し、サブクロニング用ベクターに挿入する。

【0019】こうして得られる組換えベクターを、例えば、Hanahan ら : Mol. Biol. 166, 557-580, (1983) に記載の方法によって、コンピテント細胞に導入する。宿主細胞としては、大腸菌 K12 株由来のもの、例えば、HB101 または MM294、MC1061、C600、DH1、JM109 等を挙げることができる。こうして得られた形質転換体を、例えば、Maniatis らの前述の文献に記載の方法、例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を用いる方法によって選定することができる。

#### 【0020】(F) プラスミド DNA の調製

サブクロニングによって得られたクローンから、例えば、Maniatis らの前述の文献に記載のアルカリ-SDS 法、またはボーリング法によってプラスミド DNA を精製することができる。必要により、塩化セシウム超遠心法を用いることもできる。

#### 【0021】(G) cDNA の構造解析

F 項で得られたプラスミド DNA を、各種の制限酵素で切断して制限酵素地図を作成する。更に、ジデオキシ法 [Sanger ら : J. Mol. Biol. 143, 161-178, (1980)] 等によって、ヌクレオチド配列を決定する。

#### 【0022】(H) 発現

F 項で得られたプラスミド DNA を利用し、例えば、Maniatis らの前述の文献に記載の方法により、大腸菌 YA21 株のコンピテント細胞を形質転換してクルクリン B を発現させることができる。発現用の宿主細胞としては、前記の大腸菌 YA21 株の他、大腸菌 MM2

94、DH1、DH5、JM109、HB101、GC508 または CES201 等を挙げることができる。

【0023】更に、本発明で利用することのできるベクターとしては、ColE1 系プラスミドベクターである、pUC 系（例えば、pUC7、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19）、pBR 系（例えば、pBR322、pBR325、pBR327）、更に、それらに由来する pTV118、pUC118、pUC119 等を挙げることができる。また、ファージ系ベクターとしては、λファージ由来の λgt10、λgt11、Charon4A、λgtWES・λB、EMBL3、EMBL4 等を挙げることができる。

【0024】また、酵母用の発現ベクターとしては、例えば、pYES2.0、pAH9、pMAC561、pLG669、pMA91、pAM82、pMC2010、pOP、pTE432、pSD922 等を挙げることができ、枯草菌用の発現ベクターとしては、例えば、pPL608、pKTH50、pKTH51、pKTH53、pKTH38、pHY300、pLK 等、そして、動物細胞（例えば、COS-7 細胞、Bowes 黒色腫細胞、CHO 細胞）用の発現ベクターとしては、例えば、pMT、pSV、pCD、pMDSG、pBPV 等を挙げることができる。

【0025】得られた形質転換体を適当な公知の培地において、細胞密度が十分な濃度に達するまで培養する。続いて、例えば超音波処理して細胞を破碎し、その破碎液を公知の方法によって処理してクルクリン B を精製することができる。こうして得られたクルクリン B は、味覚修飾剤、食品、医薬品等に用いることができる。

#### 【0026】

【実施例】以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

#### 【0027】実施例 1 : RNA の抽出

クルクリン・ラチフォリアの果実（開花直後から完熟まで、即ち 0 週から約 8 週までの各段階の各種果実を混合したものであって、果実全体をそのまま使用したので、果実の皮、種および果肉などの果実の全ての成分が含まれる）約 6 g をドライアイスによって凍結し、解凍しないようにして粉碎し、粉末 5 g を得た。

【0028】得られた粉末 5 g に、フェノール 15 ml、0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5、5 mM-EDTA、1% SDS) 15 ml および 1 M ジチオスレイトール 600 μl を加え、直ちに激しく振盪した。遠心分離により水層をとり、フェノール抽出をさらに 3 回行った。得られた水層には、多糖類等の RNA 以外の物質が含有されているので、1.05 容量倍の 5 M 塩化リチウムを加え、4℃で 2 時間放置した後、遠心分離して RNA を沈殿状態で得た。次いで、沈殿物をエタノールで処理し、RNA 768 μg を得た。

【0029】実施例 2 : mRNA の抽出

7

実施例1で得られたRNA 768  $\mu$ gを熱変性(65℃、10分間)した後、この熱変性RNAを含有する0.5M塩化ナトリウム溶液を調製し、この溶液をオリゴ(dT)カラム(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製のmRNA精製用スパンカラム)に通した。0.5M塩化ナトリウム溶液により非吸着画分を除去した後、塩化ナトリウムを含まない溶出液により溶出して、高濃度で存在するmRNAを8  $\mu$ g得た。

#### 【0030】実施例3：cDNAの合成

市販のcDNA合成キット(cDNA Synthesis Kit：ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)を用いて、mRNAからsscDNA、更にはdsscDNAを合成し、クレノウ断片で平滑末端としてからEcoRIアダプターを連結した。

【0031】即ち、オリゴd(T)<sub>12-18</sub>プライマー、モロニー・マウス白血病ウイルス(MMLV)の逆転写酵素、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含むバッファー(First-Strand Reaction Mix)に、熱変性したmRNA 4  $\mu$ gを含有するRNアーゼ不含有水20  $\mu$ lを加え、37℃で1時間反応させた。次に、RNアーゼH、DNAポリメラーゼI、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含むバッファー(Second-Strand Reaction Mix)に前記の反応液を加えて全量を100  $\mu$ lとし、12℃で1時間、続いて22℃で1時間反応させた。反応終了後、クレノウ断片1  $\mu$ lを加えて37℃で30分間反応させた。フェノール/クロロホルム100  $\mu$ lを加えてから1分間遠心し、上部の水層をスパンカラムで精製した。カラム溶出液100  $\mu$ lにEcoRIアダプター(構造を図1に示す)溶液4  $\mu$ l、ATP溶液1  $\mu$ lおよびT4DNAリガーゼ3  $\mu$ lを加え、穏やかに攪拌して短時間遠心した後、12℃で一晩反応させた。反応液を65℃で10分間加熱してDNAリガーゼを変性させ、氷冷してからATP溶液10  $\mu$ lおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ1  $\mu$ lを加え、穏やかに攪拌した後、37℃で30分間反応させた。反応液にフェノール/クロロホルム100  $\mu$ lを加えてから1分間遠心し、上部の水層をスパンカラムで精製し、EcoRIアダプター連結dsscDNAを得た。

【0032】実施例4：ベクターへのcDNAの挿入  
EcoRIで切断してからアルカリ・ホスファターゼで処理して脱リン酸化した $\lambda$ gt10のEcoRI部位に、実施例3で得られたEcoRIアダプター連結dsscDNAを連結した。始めにテストライゲーションを行って、最良の混合比を求めた。即ち、実施例3で得たカラム溶出液(dsscDNA 5.0 ng、15.0 ngまたは40.0 ng含有液となるようにカラム用緩衝液で希釈)30  $\mu$ lに $\lambda$ gt10の2  $\mu$ lを加え、3M酢酸ナトリウム3  $\mu$ lおよび冷エタノール60  $\mu$ lを加えて混合した後、-70℃で15分間冷却した。10分間遠

8

心して得た沈殿を乾燥し、乾燥cDNAをカラム用緩衝液9  $\mu$ lに再懸濁し、ATP溶液1  $\mu$ lおよびT4DNAリガーゼ1  $\mu$ lを加えた。攪拌後、遠心処理してから12℃で16時間反応させた。続いて、Maniatisらの前述の文献に記載の方法により、イン・ヴィトロパッケージング(Giga pack gold)を行い、組換えファージを大腸菌c600 hflに感染させたところ、40 ngのEcoRIアダプター連結dsscDNAに対して0.3  $\mu$ gの $\lambda$ gt10を混合した場合に最良の結果を与えることが分かった。そこで、この量比で、ライゲーションおよびパッケージングをスケールアップして実施し、約30万個の独立したブランクからなるライブラリーを作製した。

#### 【0033】実施例5：スクリーニング

特開平3-190899号公報に記載されたクルクリンAのアミノ酸配列に基づいて、以下の3種のプローブを作製した。以下の塩基配列で、NはA、C、GおよびT、HはA、CおよびT、DはA、GおよびT、RはAおよびG、KはGおよびT、そしてYはCおよびTの、それぞれデオキシリボ核酸残基を示す。また、合成方法は、日本生化学会編の前述の文献(遺伝子研究法I)に記載の方法を使用した。

【0034】(1) Ile-Gln-Asn-Asn-Cys-Asn(成熟クルクリンAのアミノ末端より25位から30位まで)に基づくセンスDNAプローブ(17mer；48種)：

5'-ATH-CAR-AAK-AAK-TGY-AA-3'

(2) Tyr-Gln-Asn-Gly-Arg-Gln-Ile-Trp-Ala(34位から42位まで)に基づくアンチセンスDNAプローブ(26mer；1536種)：

5'-GC-CCA-DAT-YTG-NCK-NCC-RTT-YTG-RTA-3'

(3) Phe-Val-Ile-Tyr-Gly-Pro-Val(94位から100位まで)に基づくアンチセンスDNAプローブ(20mer；768種)：

5'-AC-NGG-NCC-RTA-DAT-NAC-RAA-3'

これらの各プローブは、T4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATPにより5'末端をラベルし、以下の実施例6に使用した。

#### 【0035】実施例6：ブランクハイブリダイゼーション

実施例4で得られたライブラリーのブランクをナイロンメンブレンに移し、DNAを固定した。続いて、実施例5で調製したプローブ(1)～(3)で順にハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの温度は、プローブ(1)が33～34℃、プローブ(2)が55℃、プローブ(3)が45～46℃とした。また、

洗いの条件は、プローブ (1) ~ (3) のいずれも  $6 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC}$  は、 $0.15 \text{ M}$  塩化ナトリウム、 $0.015 \text{ M}$  クエン酸ナトリウム) とし、温度はそれぞれのハイブリダイゼーション温度と同温度とした。こうして、約 30 万個のプラークからすべてのプローブとハイブリダイズするプラーク群 16 個を得た。

#### 【0036】実施例 7 : シングルプラークの分離

実施例 6 で得た 16 個のプラーク群の各々について 2 次スクリーニングを実施した。即ち、各プラーク群を独立のプラークに別け、実施例 6 と同様にプローブ (1) ~ (3) と次々にハイブリダイズさせた。プローブ (1) ~ (3) の全てにハイブリダイズするプラークが、16 個のプラーク群の各々から 1 個ずつ得られた。こうして得られたプラークをファージ  $\lambda \text{ Q1} \sim \lambda \text{ Q16}$  と命名した。これらのファージ  $\lambda \text{ Q1} \sim \lambda \text{ Q16}$  からファージ DNA を取り出し、EcoRI で消化し、電気泳動によってインサート分子量を比較したところ、ファージ  $\lambda \text{ Q9}$  に含まれるインサートが最長 (約  $1.2 \text{ kbp}$ ) であった。

#### 【0037】実施例 8 : サブクロニング

pUC18 を用いて、ファージ  $\lambda \text{ Q9}$  に含まれるインサートをサブクロニングした。即ち、ファージ  $\lambda \text{ Q9}$  から、例えば、日本生化学会編：続生化学実験講座 I，遺伝子研究法 2，100，(1986) に記載の方法によりファージ  $\lambda \text{ Q9}$  の DNA  $30 \mu\text{g}$  を精製し、100 ユニットの EcoRI を用いて消化し、クルクリンをコードする EcoRI 断片  $400 \text{ ng}$  を調製した。一方、EcoRI で切断してからアルカリ・ホスファターゼで処理して脱リン酸化した pUC18 ( $50 \text{ ng}$ ) を調製し、前記 EcoRI 断片  $100 \text{ ng}$ 、T4 リガーゼ  $1.0 \mu\text{l}$  含有ライゲーション緩衝液 ( $0.01 \text{ mM}$  ATP、 $6.6 \text{ mM}$  塩化マグネシウム、 $10 \text{ mM}$  ジチオスレイトールを含む  $66 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH} 7.6$ )  $20 \mu\text{l}$  を加え  $12^\circ\text{C}$  で 16 時間インキュベートしてライゲーションした。

【0038】続いて、Hanahanらの前述の文献に記載の方法によって形質転換を行った。即ち、形質転換用に調製された大腸菌 MM294 のコンピテント細胞  $210 \mu\text{l}$  に、前記の cDNA-プラスミド DNA  $100 \text{ ng}$  含有緩衝液  $5 \mu\text{l}$  を加え、 $0^\circ\text{C}$  で 30 分間および  $42^\circ\text{C}$  で 80 秒間静置した後、氷冷し、SOC 培地  $800 \mu\text{l}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間振盪した。続いて、アンピシリン  $50 \mu\text{g/ml}$  を含有する  $\chi$  プロス寒天培地で  $37^\circ\text{C}$  にて培養し、プレート 1 枚当たり約 100 個の形質転換体を得た。

#### 【0039】実施例 9 : コロニーハイブリダイゼーション

実施例 8 で得たプレートのレプリカを常法によって変性および焼付処理して DNA を固定した。前記実施例 5 で調製したプローブ (2) を用い、 $55^\circ\text{C}$  でハイブリダイ

ズさせ、同じ温度にて  $6 \times \text{SSC}$  で洗った。陽性クローン 75 個が得られた。

#### 【0040】実施例 10 : プラスミド DNA

実施例 9 で陽性とされた形質転換体 1 個を、アンピシリン  $50 \mu\text{g/ml}$  含有の  $\chi$  培地  $30 \text{ ml}$  に植え継ぎ、 $37^\circ\text{C}$  で一晩振盪培養した後、 $4^\circ\text{C}$  で遠心 ( $2000 \times g$  にて 7 分間) し、菌体約  $200 \mu\text{g}$  を得た。この菌体約  $200 \mu\text{g}$  を、リゾチーム ( $10 \text{ mg/ml}$ ) 含有  $25 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $50 \text{ mM}$  グルコースおよび  $10 \text{ mM}$  EDTA 含有、 $\text{pH} 8.0$ )  $800 \mu\text{l}$  に溶解した後、Maniatisらの前述の文献に記載の方法により、プラスミド (以下、プラスミド pQ9 と称する) DNA 約  $20 \mu\text{g}$  を得た。このプラスミド pQ9 の構造を図 3 に示す (図 3 の挿入部において、矢印はクルクリン B をコードする DNA の挿入方向を示す)。

#### 【0041】実施例 11 : 制限酵素地図の作製および塩基配列の決定

プラスミド pQ9 を種々の制限酵素で切断し、図 2 に示すような制限酵素地図を作製した。更に、各種の DNA 断片をジデオキシ法 (Sangerらの前述の文献参照) によって、そのヌクレオチド配列を決定した。結果を配列表の配列番号 3 の配列に示す。配列番号 3 の配列には、塩基配列から演繹されるアミノ酸配列も示す。なお、図 2 において斜線部分はコード部分を、矢印は塩基配列を決定した方向を示す。また、配列番号 3 の配列において、5' 側および 3' 側非翻訳領域の塩基配列は 1 例である。即ち、ファージ  $\lambda \text{ Q1} \sim \text{Q16}$  の中で、ファージ  $\lambda \text{ Q9}$  以外のファージを用いて前記と同様に処理して塩基配列を決定すると、配列番号 3 の配列に示す 5' 側および 3' 側非翻訳領域の塩基配列とは部分的に異なる塩基配列を有するものが見出された。

#### 【0042】実施例 12 : 発現

Hanahanらの前述の文献に記載の方法によって発現用ベクターを作成した。即ち、プラスミド pQ9 ( $10 \mu\text{g}$ ) を EcoRI で消化し、クレノウ断片 ( $1.0 \mu\text{l}$  :  $5.0$  ユニット) で平滑化して、クルクリン B をコードする DNA 断片 (約  $1.2 \text{ kbp}$ ) を得、その DNA 断片  $100 \text{ ng}$  を HincII で消化した pUC18 ( $50 \text{ ng}$ ) に挿入して組換えプラスミドを作成した (図 4 参照)。一方、大腸菌 YA21 株をカルシウム法によりコンピテント細胞にし、前記の組換えプラスミドで形質転換した。形質転換体を、アンピシリン  $50 \mu\text{g/ml}$  を含有する  $\chi$  プロス培地  $0.2 \text{ ml}$  に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で 18 時間培養した。次いで、菌懸濁液を遠心分離 ( $3000 \times g$  にて 10 分間) し、得られた沈殿約  $5 \mu\text{g}$  を M9 培地  $1.0 \text{ ml}$  に懸濁して、予備培養した。その後、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を  $1 \text{ mM}$  の濃度で添加し、2 時間培養した。

#### 【0043】実施例 13 : 抗血清の調製



後記参考例4で調製し、参考例5で確認したクルクリンA 1mg/4mlを含む0.1MPBSリン酸生理的緩衝液(pH7.6)を抗原原液(1回分)とし、抗原原液4mlをそれぞれ等量のプロイント完全アジュバンド(FCA)、およびプロイント不完全アジュバンド(FIA)と混合して得られた油中水型エマルジョンを、FCA抗原溶液およびFIA抗原溶液とした。前記FCA抗原溶液2mlをウサギ(体重約1.5kgの雌2匹)の左右両モモに筋肉注射して免疫した(初回免疫)。初回免疫から1週間経過後、FIA抗原溶液を用いたこと以外は初回免疫と同様にして免疫を行った(追加免疫)。追加免疫から1週間経過後、ウサギの血液30ml/羽を採取し、得られた血液を室温で約2時間放置した後、3500回転で5分間遠心分離し、その上清を更に10000回転で20分間遠心分離し、その上清から抗クルクリンA抗体を含む抗血清を調製した。不溶性プロテインAを活性吸着体として用いたカラムクロマトグラフィー(カラム1.0×4.0cm、自然落下)により抗血清を処理し、精製抗血清を調製した。

#### 【0044】実施例14：ウエスタン分析

実施例12で得られた細胞を、1mM-PMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリド)を含有する10mMトリス-1mM-EDTA緩衝液(pH7.5)100μlに懸濁させ、超音波処理して菌体を破壊し、得られた破砕液3μlをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。結果を図5のレーン3に示す。図5のレーン4は対照用のレーンであり、実施例12の組換えを行っていないプラスミドで形質転換した大腸菌YA21株を前記と同様に破壊し、得られた破砕液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したものである。レーン3の左側に矢印で示すように、約17kダルトンの位置にタンパク成分が見出される。なお、マーカー(図示せず)としては、Pre-Stained SDS-PAGE Standards〔ホスホリラーゼB(110kダルトン)、ウシ血清アルブミン(84kダルトン)、オボアルブミン(47kダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ(33kダルトン)、ダイズトリプシンインヒビター(24kダルトン)およびリゾチーム(16kダルトン)含有：バイオラッドラボラトリーズ社製〕を用いた。

【0045】続いて、分離成分をニトロセルロースのメンブランフィルターに転写し、メンブランフィルターを、10mMリン酸ナトリウム緩衝液〔pH7.4；0.14M塩化ナトリウムおよび0.05%(v/v)ツイン20を含む：以下、TPBSと称する〕で室温で5分間洗浄し、更にブロッキング溶液として20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4；3%アルブミンおよび0.5M塩化ナトリウム含有)を添加し、37℃で60分間静置して、非結合部位をブロックした。実施例13で得られた精製抗血清を1500倍に希釈し、15

00倍希釈精製抗血清10mlを前記メンブランフィルターに添加し、4℃で一昼夜静置し、TPBSで3回洗浄した。続いて、2次抗体を添加し、室温で2時間静置した。2次抗体としては、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗ウサギIgG(シグマ社製)の1000倍希釈液5mlを使用した。

【0046】次に、アルカリホスファターゼ緩衝液約10mlを添加し、室温で10分間静置した後、NBT(ニトロブルーテトラゾリウム)溶液66μl、BCIP(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)溶液33μlとアルカリホスファターゼ緩衝液9.9mlからなる基質溶液を添加し、室温で5分間発色させ、続いて3%トリクロロ酢酸溶液を添加して反応を停止させ、蒸留水で洗浄した。なお、NBT溶液は、NBT50mgを70%ジメチルホルムアミド1mlに溶解して調製し、BCIP溶液は、BCIP50mgを100%ホルムアミド1mlに溶解して調製した。

【0047】結果を図5のレーン1およびレーン2に示す。レーン1はレーン3を転写したものであり、レーン2はレーン4(対照用)を転写したものである。レーン2には抗クルクリンA抗体と反応する成分が存在しないのに対し、レーン1には、その左側に矢印で示すように、レーン3の約17kダルトンの位置に現れたタンパク成分に相当する位置に抗クルクリンA抗体と反応する成分が存在する。

#### 【0048】参考例1：水洗および塩化ナトリウム水溶液による抽出

クルクリゴ・ラチフォリアの果肉30gを取り、水40mlを加えてホモジナイズし、遠心分離(12,500rpm、60分間)した。この上清は褐色を示し、味覚修飾活性はなかった。さらに得られた沈渣に、水40mlを加えてホモジナイズし、遠心分離(12,500rpm、20分間)した。この上清は、無色で、味覚修飾活性はなかった。

【0049】次に、得られた沈渣に0.5M塩化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離(30,000rpm、60分間)した。得られた上清は、無色で味覚修飾活性を示した。さらに、0.5M塩化ナトリウム水溶液40mlによる抽出操作を3回繰り返して、これら3回分の上清を合わせ、クルクリンを含む粗抽出液を得た。

【0050】参考例2：硫酸アンモニウムによる塩析  
参考例1で得られた粗抽出液に、80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離(32,000rpm、60分間)して得た沈殿を0.01Mリン酸緩衝液(pH6.8)100mlに溶解した。

#### 【0051】参考例3：CM-セファロースイオン交換クロマトグラフィー

参考例2で得られた溶液を、CM-セファロースCL-

10

20

30

40

50



6 B - カラム (直径 2. 2 × 1 8 c m、ベッド体積 6 8 m l、ファルマシア L K B バイオテクノロジー社製) に流し吸着させた。続いて、0. 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 6. 8) で素通り画分を除去した後、塩化ナトリウム溶液 0 ~ 1. 0 M の直線濃度勾配溶出法でクルクリンを溶出した (流速 5 m l / 1 時間、1 分画 5 m l、全溶出液量 5 0 0 m l)。溶出したタンパク質は 2 8 0 n m の吸収によりモニターした。その結果を図 6 に示した。図 6 に示すピーク (B) が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

【0 0 5 2】参考例 4 : 分子ふるいクロマトグラフィー  
参考例 3 で得られた、図 6 のピーク (B) の斜線部分に示された画分に、8 0 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離 (3 2, 0 0 0 r p m、6 0 分間) して得た沈殿を 0. 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 6. 8) 1. 5 m l に溶解した。この濃縮液をセファデックス (ファルマシア L K B バイオテクノロジー社製) G - 1 0 0 カラム (直径 1. 6 c m × 5 8 c m、ベッド体積 1 6 0 m l) を用い、0. 5 M - N a C l を含む 0. 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 6. 8) により分離した (流速 8. 4 m l / 1 時間、1 分画 2. 8 m l、全溶出液量 1 8 2 m l)。タンパク質は 2 8 0 n m の吸収によりモニターした。図 7 に示すピーク (A) が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

【0 0 5 3】参考例 5 : S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動

参考例 4 で得られた、図 7 のピーク (A) の斜線部分に示された画分の物質の純度および分子量を、8 M 尿素を含む、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。その結果、分子量 1 2, 0 0 0 ダルトンのところに単一バンドを示したことから、図 7 のピーク

(A) の斜線部分に示された画分の味覚修飾物質クルクリンは、純品 (クルクリン A) であることが確認できた。

【0 0 5 4】クルクリゴ・ラチフォリアの果肉 3 0 g から得られた、各クルクリン画分のタンパク質含量、活性収率および精製度は下記表 1 に示す通りである。なお、タンパク質含量は、ローリー (L o w r y) らの方法により確定した。

【0 0 5 5】また、活性は、試料を 3 分間口に含んだ後水で口をすすぎ、0. 0 2 M クエン酸溶液を味わった時の甘さを各種濃度のショ糖溶液と比較し、同等の甘さのショ糖濃度を求めることにより測定した。その結果を図 8 に示す。図 8 から判るように、高純度のクルクリン A の活性は、0. 3 M ショ糖の甘さに相当した。

【0 0 5 6】参考例 6 : 等電点電気泳動  
ファーストシステム (P h a s t S y s t e m (商標) : ファルマシア L K B バイオテクノロジー社製) により、ファーストゲル (P h a s t G e l I E F 5 - 8) を用いて、高純度クルクリン A の等電点電気泳動を行ったところ、等電点は 7. 1 であった。

【0 0 5 7】

【表 1】

表 1 クルクリンの各精製段階における  
蛋白質含量、活性収率及び精製度

精 製 段 階	蛋白質含量 (g)	活性収率 (%)	精製度 (倍)
果 肉	3 0 * 1	1 0 0	1
0. 5 M 食塩水抽出物	0. 1 0 6	8 0. 0	2 2 5
CM - セファローズ 溶 出 画 分	0. 0 1 8	5 5. 5	9 4 0
セファテックス G - 100 溶 出 画 分	0. 0 0 8 6	3 6. 0	1. 2 5 5

\* 1 : 果肉重量 (蛋白質以外の成分も含む)

【0 0 5 8】

【配列表】

【0 0 5 9】配列番号 : 1

配列の長さ : 1 1 4

配列の型 : アミノ酸

配列

配列の種類 : タンパク質

起源 :

生物名 : クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia)

15 16

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu  
1 5 10 15

Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val  
20 25 30

Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg  
35 40 45

Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile  
50 55 60

Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp  
65 70 75 80

Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile  
85 90 95

Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val  
100 105 110

Asn Gly

【 0 0 6 0 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 1 5 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 :

生物名 : クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia)

配列

Met Ala Ala Lys Phe Leu Leu Thr Ile Leu Val Thr Phe Ala Ala Val  
-20 -15 -10

Ala Ser Leu Gly Met Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu  
-5 1 5 10

His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu Thr Ile Gln  
15 20 25

Asn Lys Cys Asn Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile Trp Ala  
30 35 40

Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser  
45 50 55

Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Trp Gly  
60 65 70

Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys  
75 80 85 90

Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro  
95 100 105

Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala Lys Asp Ser  
110 115 120

Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn Asn  
125 130 135

【 0 0 6 1 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 1 1 6 6

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 :

生物名 : クルクリゴ・ラチフォリア

配列

CGCAAAGACA ATG GCG GCC AAG TTT CTT CTC ACC ATT CTT GTC ACC TTT 49  
Met Ala Ala Lys Phe Leu Leu Thr Ile Leu Val Thr Phe  
-20 -15 -10

GCG GCC GTC GCT AGC CTT GGC ATG GCC GAC AAT GTC CTG CTC TCC GGG 97  
Ala Ala Val Ala Ser Leu Gly Met Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly  
-5 1 5

17	CAA ACT CTG CAT GCC GAC CAC TCT CTC CAG GCG GGC GCC TAT ACC TTA	18	145
	Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu		
10	15	20	
ACC ATA CAA AAC AAG TGC AAC CTG GTG AAA TAC CAG AAC GGC AGG CAG			193
Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln			
25	30	35	
ATC TGG GCT AGC AAC ACT GAC AGG CGG GGC TCC GGC TGC CGC CTC ACA			241
Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr			
40	45	50	55
TTG CTG AGT GAC GGC AAC CTC GTT ATC TAC GAC CAC AAC AAC AAC GAC			289
Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp			
60	65	70	
GTG TGG GGC AGC GCC TGC TGG GGC GAC AAC GGC AAG TAT GCT CTT GTT			337
Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val			
75	80	85	
CTT CAG AAG GAT GGC AGA TTT GTC ATC TAT GGC CCG GTT TTG TGG TCC			385
Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser			
90	95	100	
CTT GGC CCT AAT GGC TGC CGC CGT GTT AAT GGT GGA ATC ACA GTT GCT			433
Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala			
105	110	115	
AAG GAT TCT ACT GAA CCA CAA CAT GAG GAT ATT AAG ATG GTG ATT AAT			481
Lys Asp Ser Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn			
120	125	130	135
AAT			
Asn			
136			
TAATCAAGTG AGAGGATTGT TATGAGAATA ATGAGTGGAA TGGAAGACCA ATCTCATGTC			544
GGTGTGGCCT ATCTCCACCT GTTTGCAGTG CCTTTGTAA AATAACACAT TGGGGAATAA			604
TAAAGTGAAG CTATATAGAT TGGTTCAGCA AATTTTCTGT TCAGTTTTCC TCTCACATGT			664
CAATGTCGAT TTTTGGCCGC GGATCATACA TGTGCTTGGT ATTCTAATCG ATAGAATTAT			724
GGCTCAAATG GAGGCAGGGA TTATGAGAGT TTATTCGCAT CTCCGGGTCT TCCAACCTAC			784
GAATTATAAC AAGATTCAAG GATGCATCTG AGAGCCAACT TAACGTCTTA CATCAAAGGA			844
GCTAGCCGAA GTTTATTCCC AGAGCTAGAG GAAGTTCGCT GCCATGGTTG ATAGTACAAG			904
TAGAACGACG CATGTATTGC TTCCAGGAAT CACTTCCAGC TTCTCGACAC CTCCAGTGGC			964
CTTTTCACCA CCGAAAGCAC CACCAATTTT AGCAACATTG GTAGGTATAT TTACATTAAC			1024
AATACCACAG TCACTGCCAT GGGGTCCAAT CCACTTGAAA ATAACCTCAG GTCTACGAGT			1084
GAAATAGAA CTGCTTAAAC TTGCGGTACA GAGTTATTTA TTTCAATTGC TTCTTTCAGA			1144
GTCTGGAATT TCATTACGTA AA			1166

## 【図面の簡単な説明】

【図1】EcoRIアダプターの構造を示す説明図である。

【図2】クルクリンBをコードするクローン化DNAの制限酵素地図である。

【図3】プラスミドpQ9の構造を示す説明図である。

【図4】発現プラスミドの作成過程および構造を示す説明図である。

【図5】電気泳動およびそのウェスタン分析の結果を示す図面に代わる写真である。

40 【図6】クルクリン・ラチフォリアの果実から水洗、抽出、塩析操作によって得た味覚修飾物質のCM-セファロースイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

【図7】図6のピーク(B)の斜線部分に示された画分の、セファデックスG-100分子ふるいクロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

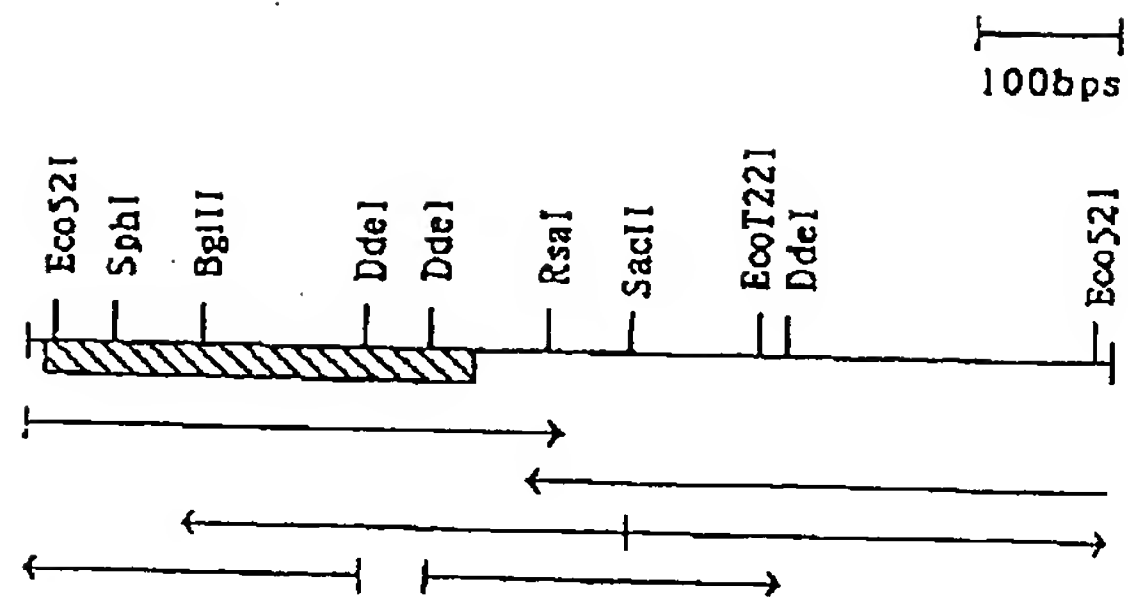
【図8】高純度クルクリンAからなる味覚修飾物質の活性を示すグラフである。



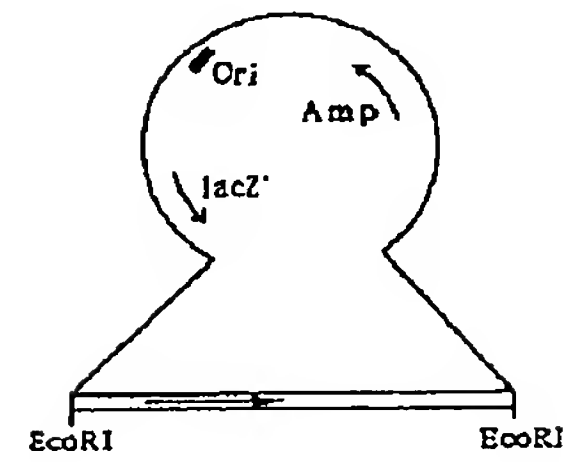
【図 1】

AATTTCGGCACGAG  
GCCGTGCTCp

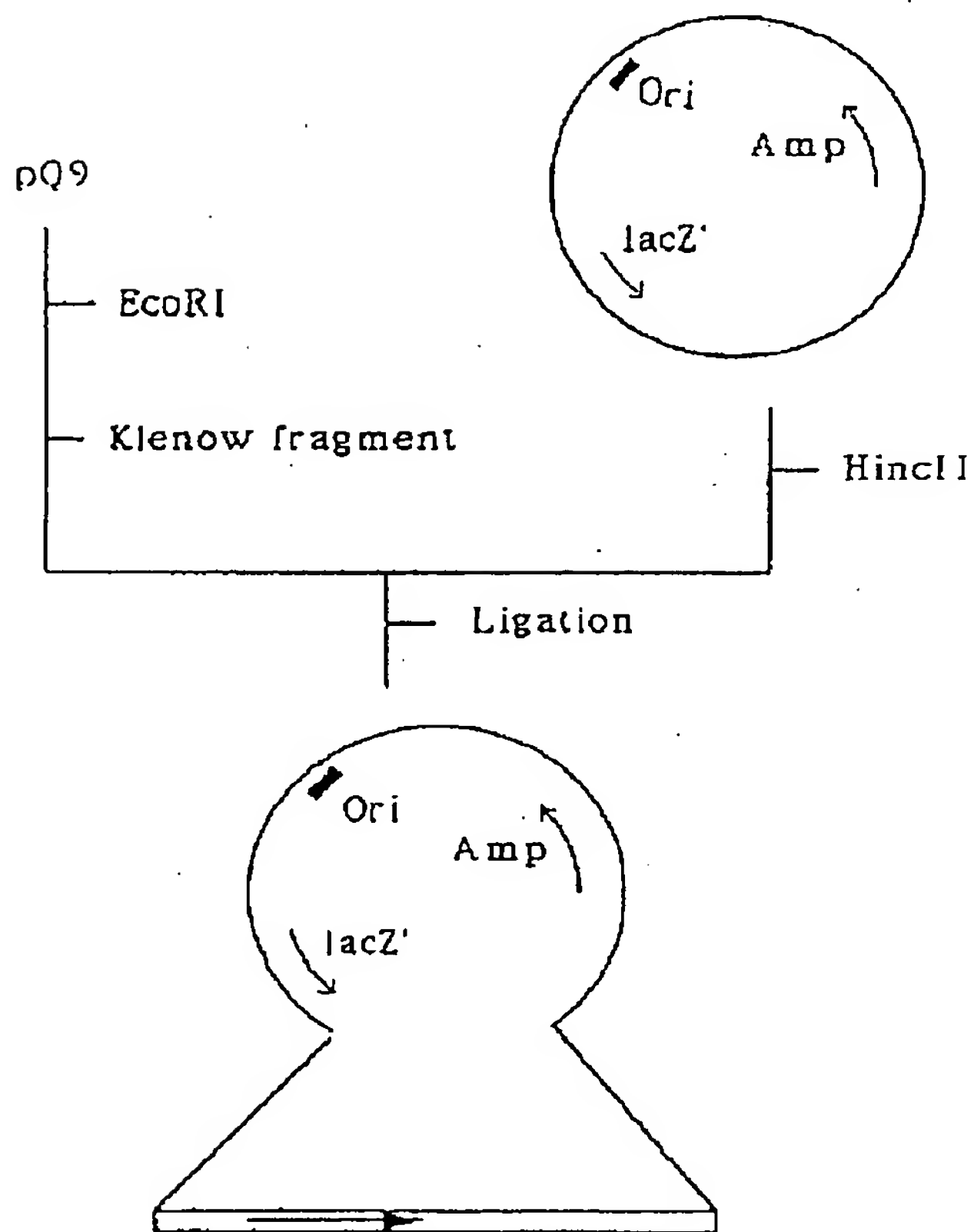
【図 2】



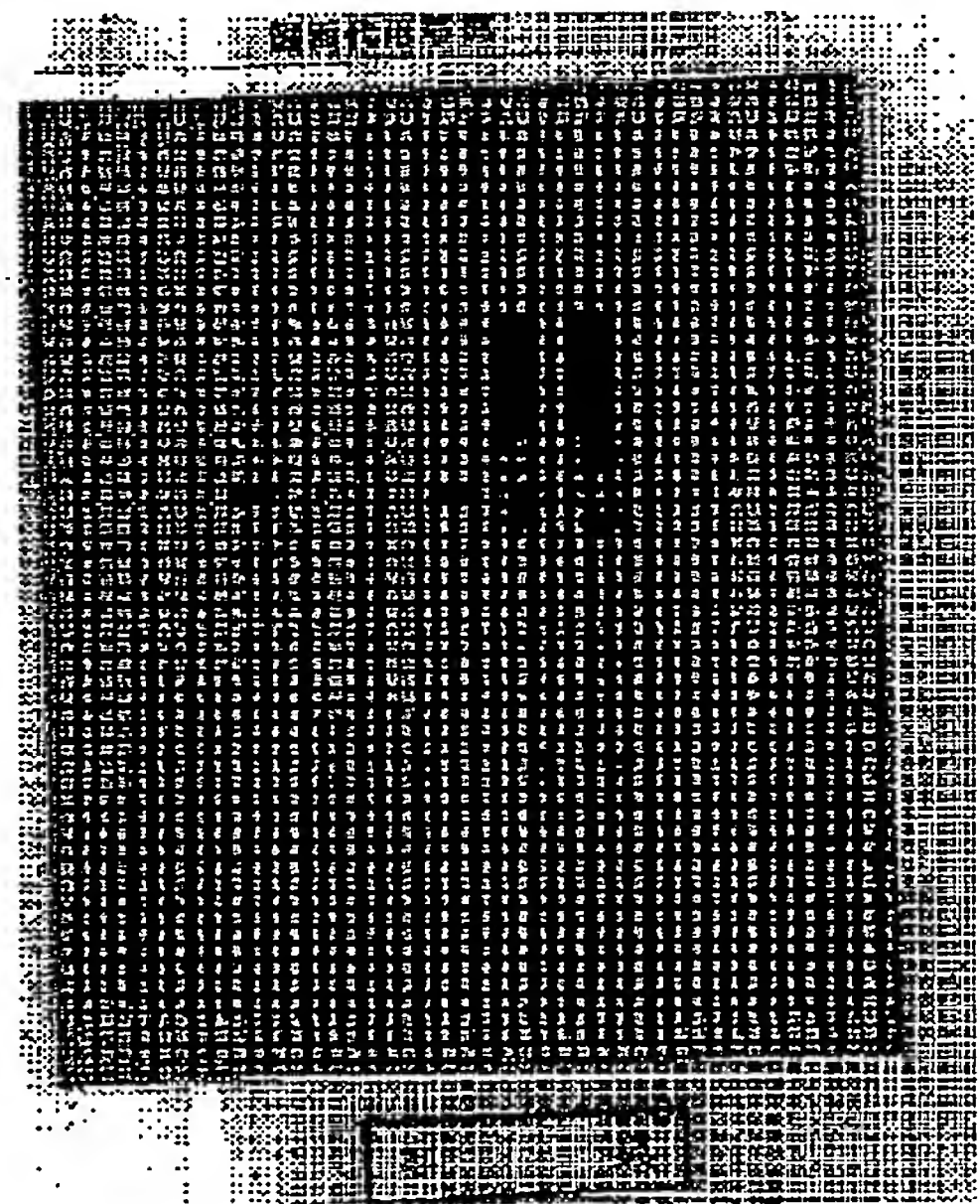
【図 3】



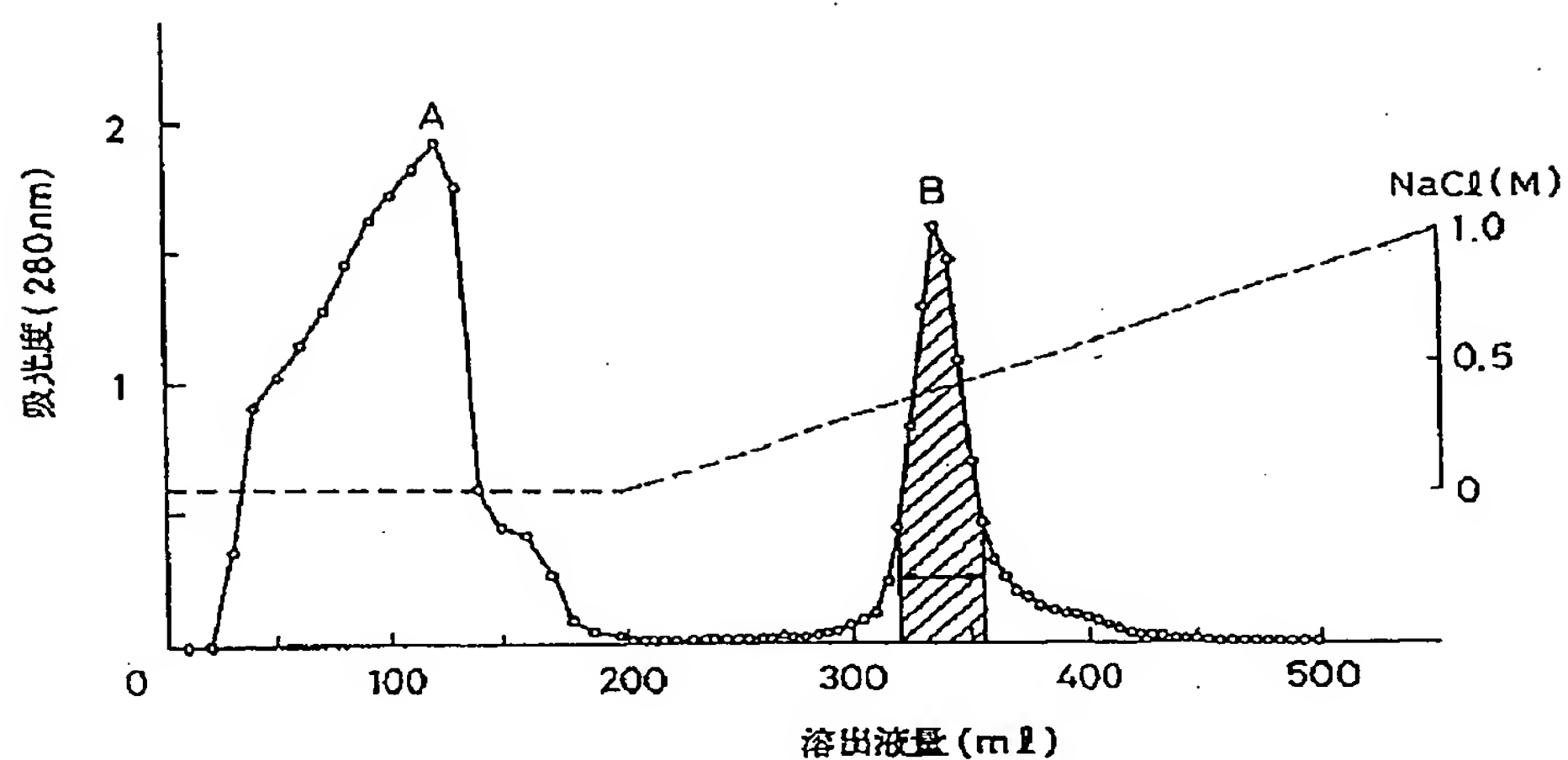
【図 4】



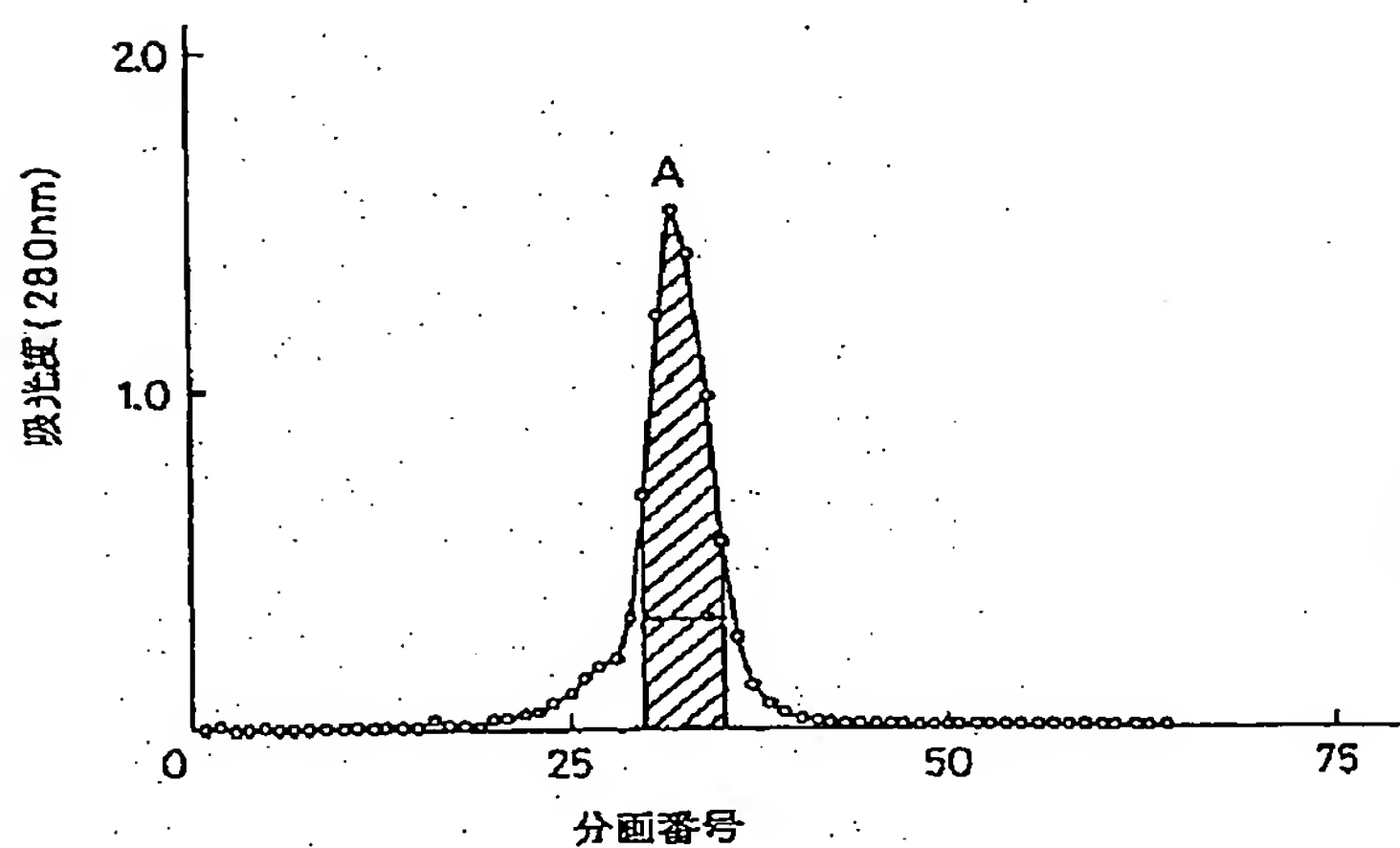
【図 5】



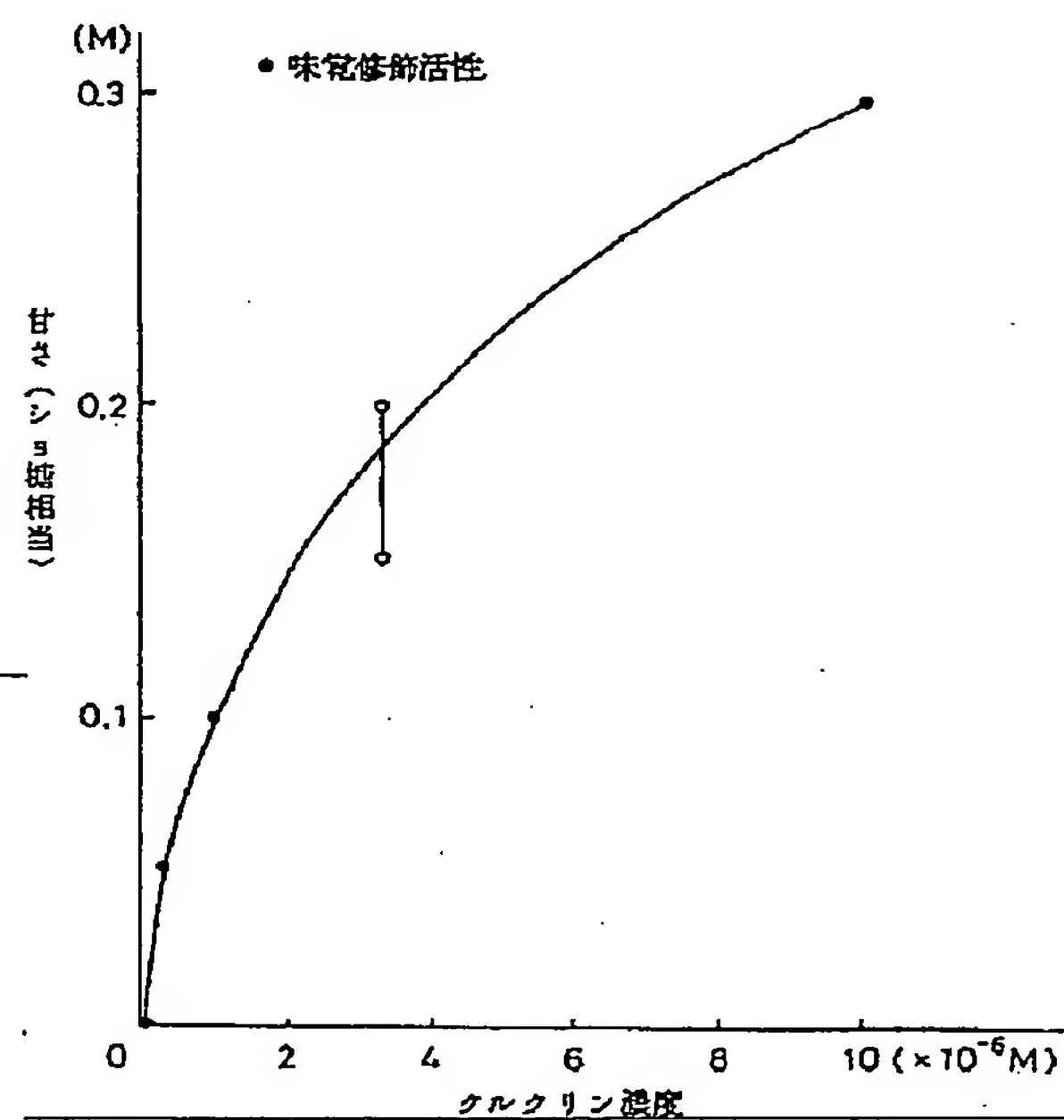
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

C12P 21/02

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(C12P 21/02

C12R 1:19 )

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 8214-4B

9050-4B

C12N 15/00

A

- (72) 発明者 荒井 綜一  
神奈川県横浜市神奈川区七島町 3 8
- (72) 発明者 阿部 啓子  
埼玉県蕨市南町 1 - 1 6 - 1 5
- (72) 発明者 山下 治之  
東京都荒川区東尾久 7 - 2 - 3 5 旭電化  
工業株式会社内